

文章编号: 1001—4721 (2013)01—0003—04

梅花鹿生茸区骨膜细胞基因片段测序分析

鲁晓萍, 孙红梅, 褚文辉, 王大涛, 赵海平, 李春义^{*}

(中国农业科学院特产研究所吉林省特种经济动物分子生物学省部共建国家重点实验室, 长春 130112)

摘要: 在已经构建的梅花鹿生茸区骨膜细胞 cDNA 表达文库的基础上对文库中的噬菌斑进行随机挑取筛选, 对筛选出来的噬菌斑进行质粒亚克隆、鉴定及表达序列标签序列测定和生物信息学分析。通过随机筛选及生物信息学分析的方法发现, 在梅花鹿生茸区骨膜细胞中有特殊意义的基因或者基因片段。随机挑选表达频率比较高的 11 个基因片段中有 6 个基因片段具有重要意义, 对这 6 个基因片段进行了生物信息学分析, 为进一步的鹿茸生物学研究打下了基础。

关键词: 鹿茸; 生茸区骨膜; 表达序列标签序列; cDNA 文库; 基因克隆

中图分类号: Q785

文献标识码: A

Analysis of EST Sequences of Antlerogenic Periosteum Cells in Sika Deer

LU Xiao—ping, SUN Hong—mei, CHU Wen—hui, WANG Da—tao,
ZHAO Hai—ping, LI Chun—yi^{*}

(State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economical Animals, Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China)

Abstract: This research based on the constructed cDNA Library of antlerogenic periosteal cells of sika deer. In order to identify isolate important genes or gene fragments through random selection, we picked some of the bacteriophage plaques from the library, after that we sub—cloned them and analysed their EST sequences. The results demonstrated that six out of the eleven gene fragments may play important role in deer antler biology.

Key words: deer antler; antlerogenic periosteum; EST sequences; cDNA library; gene clone

鹿茸是已知哺乳动物中唯一能够在失去后还能完全再生的器官。研究证明鹿生茸区骨膜是鹿茸发生和再生的组织基础。Li 等对该骨膜及鹿茸的发育进行了大量的研究, 这些研究证实该骨膜具有极强的自我分化能力, 是鹿茸发生的干细胞组织^[1, 2]。鹿茸的发生是由干细胞组织介导与外表皮相互作用的过程^[3], 在激素和一些其他小分子调控作用下^[4], 促使了组织发生和器官发生。但是, 目前调控梅花鹿生茸骨膜干细胞的小分子物质还未能得到有效的分离, 小分子物质的分离还处于初步研究过程中,

我们还无法知道都有哪些基因参与表达了这些小分子物质。目前, 表达序列标签 (Expressed sequence tag, EST) 序列测定分析的随机筛选方法能够为处于初期研究的小分子物质分离提供线索和基础。EST 序列是基因表达的短 cDNA 序列, 它们携带着完整基因某些片段的信息^[5], 通常包含了基因足够的结构信息区, 从而与其它基因相区分。大规模随机选取克隆进行表达序列标签测序分析, 将直接发现在某个重要生理过程或疾病中具有新功能的新基因或候选基因, 获得基因组中与生物学、医学和生物制

收稿日期: 2012—12—03

基金项目: 973 前期研究专项 (2011CB111515); 国家自然科学基金 (31070878); 吉林省自然科学基金 (20101575)

作者简介: 鲁晓萍 (1981—), 女, 山东省临沂人, 研究实习员, 硕士, 从事鹿茸生物学研究。

^{*}通讯作者: 李春义, E—mail: chunyi. li@agresearch. co. nz

药等关系最密切的信息。本研究在已构建的梅花鹿生茸区骨膜细胞 cDNA 表达文库的基础上^[6], 对表达文库中的噬菌斑进行了随机挑取筛选, 对筛选出来的噬菌斑进行进一步亚克隆、鉴定及 EST 序列测定和分析, 目的是通过随机筛选的方法找到在梅花鹿生茸区骨膜细胞中有特殊意义的基因或者基因片段, 从而揭示鹿茸发生和再生的机制。

1 材料与方法

1.1 cDNA 表达文库与菌株

梅花鹿生茸区骨膜细胞 cDNA 表达文库及 *E. coli* BM 25.8、DH 5 α 、BL21(DE3)pLysE 等菌株均由中国农业科学院特产研究所吉林省特种经济动物分子生物学省部共建国家重点实验室保存。

1.2 主要试剂

TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit、IPTG (TaKaRa 公司); 麦芽糖、抗生素 (Amresco 公司); *Taq* DNA 聚合酶、DNA Maker、PCR 试剂 (大连宝生物工程有限公司); SM 液 (20mL 5M NaCl, 10mL 1mol/L MgSO₄, 50mL 1mol/L MTris-HCl pH 7.5, 5mL 2% 明胶)、LB 培养液 (中国农业科学院特产研究所吉林省特种经济动物分子生物学省部共建国家重点实验室配制)。

1.3 DH 5 α 感受态细菌的制备

接种复苏菌株 DH 5 α 于含有 LB 培养基的平板上, 挑取单菌落于 LB 培养液中培养, 取处于对数生长早、中期的细菌培养至 OD₆₀₀ 为 0.6, 取所培养细菌冰浴, 然后加入冰冷的 CaCl₂ 溶液冰浴 45min, 离心, 加入冰冷的 CaCl₂ 溶液重悬菌体沉淀, 加入 7% ~ 8% 的二甲基亚砷于 -70℃ 保存备用。

1.4 铺平板进行噬菌斑随机挑选

用 SM 液稀释所构建的 cDNA 文库至 2 × 10⁴ pfu/100 μ L。100 μ L cDNA 文库与 200 μ L 新培养的 BL21(DE3)pLysE 混合, 37℃ 静置培养 30min, 使噬菌

体感染细菌, 将感染过的混合物倒于 2 XYT 平板表面, 倒置培养至噬斑为 0.5 ~ 1mm, 随机挑选噬菌斑, 过夜洗脱, 扩增随机挑取的噬菌斑, 进行亚克隆。

1.5 cDNA 噬菌体文库向 cDNA 质粒文库的亚克隆

参照文献方法^[7]制备 *E. coli* BM 25.8 感受态, 将宿主菌 *E. coli* BM 25.8 在 LB 培养液中过夜振荡培养。将 100 μ L 随机挑选的噬菌体稀释液 (通常为 1:50 到 1:500) 与 100 μ L 宿主菌混合, 将混合物静置培养, 挑取菌落液体培养扩增, 涂布菌落, 过夜培养, 挑单菌落, 提取质粒。

1.6 亚克隆质粒的提取和转化

亚克隆质粒提取按照 TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit 说明书进行操作, 提取完质粒进行电泳和 PCR 鉴定。将鉴定完毕的质粒转化到感受态细菌 DH 5 α 。恢复 DH 5 α 的抗药性, 涂平板, 挑单菌落, 摇菌过夜培养。将梅花鹿生茸区骨膜细胞 cDNA 表达文库中随机测序的 11 个基因片段分别命名为 APU1、APU2、APU3、APU4、APU5, AP1、AP2、AP3、AP4、AP5、AP6。

1.7 菌液的 PCR 扩增鉴定

设计引物: 上游 5'-GCACCATCATCATCATCAT-3'
下游 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
(T7 terminator primer)

PCR 反应体系: 菌液 4 μ L, 上下游引物各 1 μ L, dNTP mix 4 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (1.25U) 0.2 μ L, 10× buffer 5 μ L, 灭菌去离子水 34.8 μ L, 体积为 50 μ L。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 3min, 94℃ 变性 1min, 58℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 循环 35 次; 72℃ 延伸 6min。扩增完成后, 取 PCR 产物 5 μ L, 1.0% 琼脂糖凝胶 (含 10 μ g/mL 溴化乙锭) 电泳检测。检测完成将菌液送测序公司测序, 获得基因序列, 进行基因分析。

2 结果

2.1 菌液 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳



注: M. Marker 2 000; 泳道序列从 1 到 11 分别代表序列 AP1、AP2、AP3、AP4、AP5、AP6、APU1、APU2、APU3、APU4、APU5

Note: M stands Marker 2 000; The Electrophoresis channels stand: AP1、AP2、AP3、AP4、AP5、AP6、APU1、APU2、APU3、APU4、APU5

图 1 菌液 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis of PCR products of DH 5 α

2 2 所测 11 个 EST 片段中 AP1 ~ AP6 的核苷酸序列

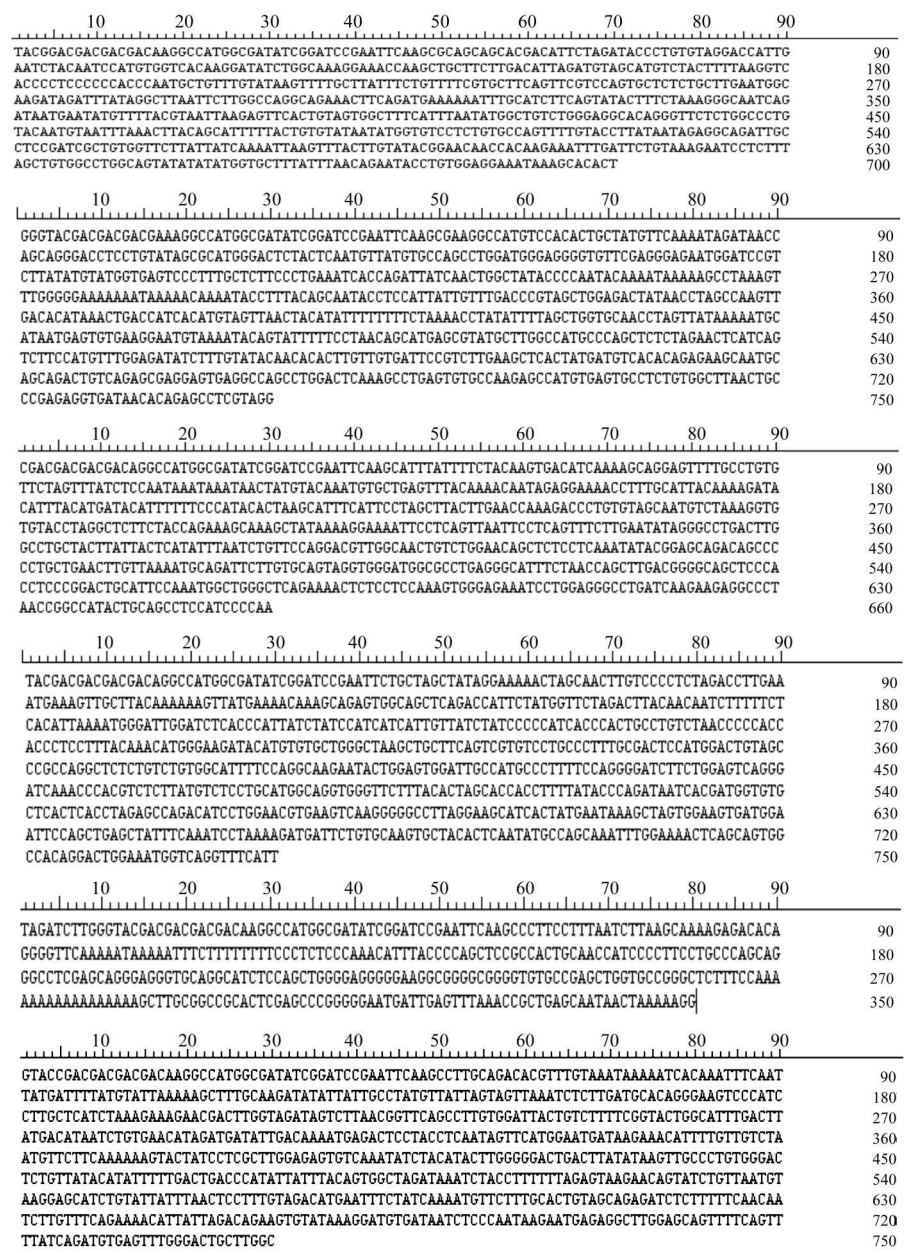


图 2 AP1 ~ AP6 的核苷酸序列

Fig. 2 The DNA sequences of AP1 ~ AP6

2 3 序列结果分析

将获得的序列用 Blast 软件分析并与 Gene Bank 数据库中的已知基因进行同源性比较。分析结果表明, 这 11 个基因片段是梅花鹿生茸区骨膜中的新基因, 虽然它们在其它哺乳动物组织中已经得到了研究。其中 5 个基因片段 (APU1、APU2、APU3、APU4、APU5) 同其它哺乳动物常见基因组基因具有较高的同源性, 在另外 6 个基因片段 (AP1、AP2、AP3、AP4、

AP5、AP6) 中, 有些同其它哺乳动物中有关的免疫学、肿瘤生物学基因片段具有较高的同源性; 有些同已知基因的同源性不是很高, 因此不能排除是目前尚未知的新基因, 为研究鹿茸再生的候选基因。

3 讨论

本实验在亚克隆过程中使用了 E. coli BM 25. 8 菌, 此宿主菌表达 P1 cre 重组酶, 该重组酶识别并切割噬菌体的 loxP 位点从而形成完整的质粒, 即通过

此位点专一性重组质粒的亚克隆^[8]。由 cre 重组酶产生的质粒为质粒多聚体的混合物,故直接从 E. coli BM 25.8 中小量提取的质粒是不能用于凝胶电泳分析和测序的,所以将亚克隆质粒转化到宿主菌 DH 5 α 后,再提取质粒进行 PCR、测序分析等。

本实验测了 11 个序列,将获得的序列用 Blast 软件分析并与 Gene Bank 数据库中的已知基因进行同源性比较,其中基因片段 AP1 同牛泛素特异性肽酶 34 基因具有很高的同源性,同源性为 99%。如果能够在梅花鹿生茸区骨膜中对该基因进行定位,进一步纯化表达该基因的细胞,并对这些细胞进行培养,通过有效物质的诱导,追踪其在细胞中的信号传导途径,将有可能揭示其调控系统;基因片段 AP2 同人的血栓调节蛋白基因高度同源(80%),基因片段 AP2 在鹿茸组织快速有序而没有检测到癌变发生的生长过程中是否起到了调节作用有待进一步研究;基因片段 AP3 同牛的 T 细胞表面受体基因高度同源,同源性为 79%,在鹿生茸区骨膜可能同机体免疫有关;基因片段 AP4 同朊病毒前蛋白具有同源性(61%),但是它在生茸区骨膜细胞中的作用不清楚;基因片段 AP5 同猪类胰岛素生长因子结合蛋白-2 高度同源(75%)。如果能够通过基因片段 AP5 的序列设计引物,对其表达量进行测定,有可能为揭示鹿茸组织有序快速生长,但检测不到癌变发生的现象提供线索;基因片段 AP6 类似人 NF κ B(核转录因子 KB)基因片段,同源性为 71%,进一步地研究将揭示 NF κ B 是否也在鹿角的脱落过程中起到了凋亡作用。

通过本研究将进一步确认梅花鹿生茸区骨膜在分子水平上也是一种特殊的组织。在测序的 11 个

EST 片段中,虽然有些与哺乳动物组织中已知基因的同源性较高,但有些较低。进一步地研究将确定这些同源性较低的基因是由于种属之间的差异所致,还是它们本身就是从未发现的新基因。如果是后一种情况的话,则认为梅花鹿生茸区骨膜将是一种开发新基因的难得的组织。因此,该组织将在分子生物学研究领域至关重要。

参 考 文 献

- [1] 赵海平. 青海血蚬幼蚬 cDNA 表达文库的构建及其保护性抗原基因的免疫学筛选[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(6): 461—464.
- [2] 岳占碰, 邓旭明, 冯海华. 鹿茸角发育与再生机理[J]. 经济动物学报, 2005, 9(1): 46—49.
- [3] 林俊堂, 李玉昌, 张会勇, 等. 常氏肝癌细胞 cDNA 文库的构建及 ADAMs 相关基因的免疫筛选与序列分析[J]. 遗传, 2004, 26(6): 793—796.
- [4] 鲁晓萍. 梅花鹿生茸区骨膜干细胞 cDNA 表达文库的构建[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009, 115(3): 115—117.
- [5] Goss RJ, Powel RS. Induction of Deer Antlers by Transplanted Periosteum I. Graft Size and Shape[J]. Exp Zool, 1985, 235: 359—373.
- [6] Li C, Suttie JM. Deer Antlerogenic Periosteum: a Piece of Postnatally Retained Embryonic Tissue[J]. Anat Embryol, 2001, 204: 375—388.
- [7] Li C, Yang F, Li G, et al. Antler Regeneration: a Dependent Process of stem tissue primed via interaction with its enveloping skin[J]. Exp Zool, 2007, 307A: 95—105.
- [8] Shen Yangmei, Liu Shuyun, Zhao Xia. Construct of cDNA Expression Library of Human Decidua and Immunoselection of Serum[J]. West China Medical, 2005, 20(3): 456—457.